



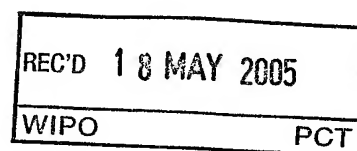
PCT/IB 2005/000782

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000605**



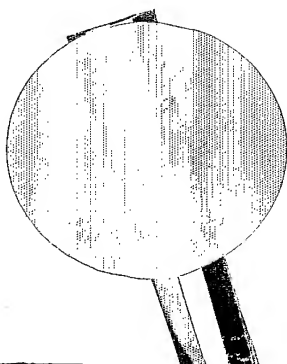
Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li..... **21 APR. 2005**

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto
Giampietro Carlotto



4601PTIT

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	COIMEX S.C.R.L. UNITED COMPANIES		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 01595420355
INDIRIZZO COMPLETO	A4	REGGIO EMILIA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	PERBELLINI ALBERTO		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PF	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 03191060239
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VERONA		
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Esteri butirrici dell'acido ialuronico a basso grado di sostituzione, procedimento per la loro preparazione ed uso		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	PERBELLINI ALBERTO
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	CORADINI DANILA
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2 C08B	E3 37	E4 A61K	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1				
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	DR.SSA GEMMA GERVAZI <i>[Signature]</i>				

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/ E SOTTOINDICATA/ E PERSONA/ E HA/ HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	N. 238 GERVASI GEMMA
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.
INDIRIZZO	I3	C.SO DI PORTA VITTORIA 9
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	N. 1 DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DELLA LETTERA D'INCARICO

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	1		42
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	1		6
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	0		
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO	0		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	0		

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO	NO
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

EURO	DUECENTONOVANTUNO/80.=		
X	D		F
SI			
NO			

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI
PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA
AUTENTICA? (SI/NO)

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ
AL PUBBLICO? (SI/NO)

DATA DI COMPILAZIONE **29 MARZO 2004**

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

DR.SSA GEMMA GERVASI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 0 0 0 6 0 5		
C.C.I.A.A. DI	MILANO		COD. 15
IN DATA	29.03.2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/ HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	00	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	TIMBRO DELL'UFFICIO		L'UFFICIALE ROGANTE CORTONESI MAURIZIO

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA:

MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

DATA DI DEPOSITO:

29 Marzo 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO
COIMEX S.C.R.L. UNITED COMPANIES
REGGIO EMILIA
PERBELLINI ALBERTO
VERONA
CORADINI DANILA
MILANO

C. TITOLO

Esteri butirrici dell'acido ialuronico a basso grado di sostituzione, procedimento per la loro preparazione ed uso

	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E. CLASSE PROPOSTA		C08B	37	A61K	

O. RIASSUNTO

L'invenzione riguarda esteri butirrici dell'acido ialuronico in cui i gruppi ossidrilici sono parzialmente esterificati con residui butirrici, caratterizzati da un grado di sostituzione di residui butirrici (rapporto tra il numero di residui di acido butirrico ed unità disaccaridica GlcNAc-GlcUA) inferiore a 0.1. Tali esteri a basso grado di sostituzione sono ottenuti mediante un procedimento effettuato in fase omogenea ed in condizioni anidre, e dove l'acido ialuronico è utilizzato in forma di un sale quaternario dell'azoto.

Gli esteri dell'invenzione risultano avere maggior attività antiproliferativa degli esteri corrispondenti con grado di sostituzione maggiore, in particolare contro i tumori primitivi e metastatici, dove tali tumori sono primitivi di origine epatica, oppure sono metastasi epatiche.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è rappresentato da composizioni farmaceutiche, contenenti quali principio attivo almeno uno degli esteri descritti.



FIRMA DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

DR. SSA GEMMA GERVASI

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Esteri butirrici dell'acido ialuronico a basso grado di sostituzione,
procedimento per la loro preparazione ed uso"

a nome di: COIMEX S.C.R.L. UNITED COMPANIES

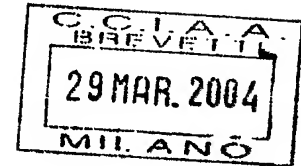
con sede in: REGGIO EMILIA

a nome di: PERBELLINI ALBERTO

Residente in: VERONA

a nome di: CORADINI DANILA

con sede in: MILANO



MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

Inventori designati : PERBELLINI Alberto, CORADINI Danila

depositata il con il n.

* * * * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda composti polisaccaridici sostituiti dotati di attività antiproliferativa.

TECNICA ANTERIORE.

L'acido butirrico esplica una notevole attività antiproliferativa inibendo la crescita cellulare ed inducendo il differenziamento di una grande varietà di cellule con fenotipo alterato come dimostrato sperimentalmente su varie linee cellulari di origine neoplastica.

I meccanismi molecolari alla base dell'attività biologica dell'acido butirrico sono principalmente da ricollegarsi all'azione inibitoria che il composto esercita sull'attività dei componenti della famiglia delle iston-deacetilasi, enzimi che, assieme alla iston-acetil-transferasi, regolano la trascrizione genica, modulando il grado di acetilazione degli istoni, le

proteine strettamente associate al DNA.

Sebbene dotato di un buon potenziale clinico-applicativo, il sale sodico dell'acido butirrico presenta lo svantaggio di avere un brevissimo tempo di emivita che ne limita fortemente l'impiego clinico a causa della difficoltà di ottenere concentrazioni plasmatiche sufficienti ad esercitare un effetto terapeutico. Infatti, una volta somministrato per via endovenosa, il butirrato di sodio ha un tempo di emivita di soli 5-6 minuti prima di essere metabolizzato.

Tra gli approcci esplorati per ovviare a tale inconveniente va innanzitutto ricordato quello chimico, mirato alla stabilizzazione della molecola per esterificazione, al fine di ritardarne la degradazione e prolungarne l'attività biologica. Sono noti, infatti, alcuni esteri semplici dell'acido butirrico come il butirrato di fenile, noto per esplicare un'attività antineoplastica in diverse forme tumorali tra le quali il cancro alla prostata (Proceedings of the American Association for Cancer Research, vol. 37, marzo 1996, 498). In questo caso, l'esterificazione ha semplicemente lo scopo di aumentare l'emivita plasmatica del principio attivo, trasformando il composto in un pro-farmaco che, per idrolisi, provoca il lento rilascio dell'acido butirrico nell'organo bersaglio. L'attività di tali esteri risulta però sempre inferiore a quella dell'acido libero a causa della minore biodisponibilità del principio attivo.

Un approccio alternativo è stato quello di incapsulare la molecola in strutture liposomiche in grado di fornirle una maggiore protezione dalla degradazione e la veicolazione a concentrazioni maggiori (G. Storm et al., Biotherapy, 3:25, 1991); anche in tale caso i risultati ottenuti non

sono soddisfacenti a causa della bassa efficienza di intrappolamento delle vescicole liposomiche.

EP 0356275 descrive glicosamminoglicani in cui i gruppi ossidrilici e amminici sono sostituiti con gruppi funzionali acilici oppure solfati. US 5,185,436 descrive invece la preparazione di derivati dell'acido butirrico in cui la molecola attiva è legata in modo covalente (legame estereo) a un vettore atossico. In US 6,140,313 sono infine descritti esteri dell'acido ialuronico (HA) con l'acido butirrico ottenuti con un procedimento in cui l'acido ialuronico viene disciolto in H_2O , acidificato e precipitato mediante aggiunta di sali di collidinio. Anche quando l'HA viene disciolto in dimetilformammide (DMF), il procedimento non risulta totalmente anidro e gli esteri ottenuti hanno un grado di sostituzione (rapporto tra il valore medio di moli di residui butirrici ed il numero di moli dell'unità disaccaridica [GlcNAc-GlcUA]) mai inferiore a 0.1.

SOMMARIO

L'invenzione riguarda esteri butirrici dell'acido ialuronico in cui i gruppi ossidrilici sono parzialmente esterificati con residui butirrici, caratterizzati da un grado di sostituzione di residui butirrici (rapporto tra il numero di residui di acido butirrico ed unità disaccaridica GlcNAc-GlcUA) inferiore o uguale a 0.1. Tali esteri a basso grado di sostituzione sono ottenuti mediante un procedimento effettuato in fase omogenea ed in condizioni anidre, e dove l'acido ialuronico è utilizzato in forma di un sale quaternario dell'azoto. In una sua realizzazione preferita il processo comprende i seguenti passaggi:

- a) dissoluzione di un sale quaternario dell'azoto dell'acido ialuronico

in concentrazione compresa tra 1-100 g/l in un solvente polare aprotico, opzionalmente riscaldando a temperature superiori a 50°C,

- b) preparazione del reattivo acilante mediante miscelazione, in solvente polare aprotico, di anidride butirrica e di una dialchilamminopiridina,
- c) aggiunta del reattivo acilante alla soluzione del sale dell'acido ialuronico in condizioni anidre,
- d) purificazione del prodotto di reazione o alternativamente conversione dell'estere ottenuto nel sale sodico corrispondente mediante acidificazione.

Gli esteri dell'invenzione risultano avere maggior attività antiproliferativa degli esteri corrispondenti con grado di sostituzione maggiore, in particolare contro i tumori primitivi e metastatici, dove tali tumori sono primitivi di origine epatica, oppure sono metastasi epatiche.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è rappresentato da composizioni farmaceutiche, contenenti quali principio attivo almeno uno degli esteri descritti.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'estere butirrico dell'acido ialuronico HE2.

Il DS di HE2 (0.2) è stato calcolato integrando e normalizzando il segnale relativo al gruppo metilico (δ 0.83 ppm, tripletto) del residuo butirrato rispetto al segnale del gruppo metilico (δ 1.92 ppm, singoletto) del gruppo N-acetile appartenente al residuo glucosamminico della struttura polisaccaridica.

Figura 2. Analisi CE-UV dei prodotti d'idrolisi dell'estere butirrico



dell'acido ialuronico HB4 preparato secondo l'Esempio 4. Tampone utilizzato: Borax 50 mM. Attribuzione dei picchi: [1] HA; [2] acido butirrico.

Figura 3. Confronto dell'effetto antiproliferativo di dosi scalari di esteri butirrici dell'acido ialuronico a diverso grado di sostituzione in cellule di carcinoma del colon (HT29) e di epatocarcinoma (HepB3).

L'effetto degli esteri secondo l'invenzione sulla proliferazione cellulare è stato valutato con metodo colorimetrico (MTT) ed espresso come percentuale di inibizione rispetto al controllo costituito da cellule mantenute nel solo terreno di coltura.

Pannello A: È riportato l'effetto di inibizione della crescita indotto da quattro esteri butirrici (HE3/T, HB4, HB10 e HB11) rispetto al sodio butirrato nella linea cellulare di carcinoma del colon HT29.

Sodio butirrato (NaB): -■- ; estere butirrico con d.s. 0.1 (HE3/T): -●- ; estere butirrico con d.s. 0.062 (HB4): -▲- ; estere butirrico con d.s. 0.025 (HB11): -▲-; estere butirrico con d.s. 0.004 (HB10): -▼-.

Pannello B: È riportato l'effetto di inibizione della crescita indotto da tre esteri butirrici (HB4, HB10 e HB11) rispetto al sodio butirrato nella linea cellulare HepB3.

Sodio butirrato (NaB): -■-; estere butirrico con d.s. 0.062 (HB4): -▲-; estere butirrico con d.s. 0.025 (HB11): -▲-; estere butirrico con d.s. 0.004 (HB10): -▼-.

Figura 4. Effetto antiproliferativo dose-dipendente del trattamento con gli esteri dell'invenzione. L'estere HB10 (Ha-But) preparato nell'Esempio 2 in confronto al sodio butirrato (NaB) (pannelli superiori, in funzione

della concentrazione in mM di residui butirrici) o all'acido ialuronico (HA) (pannelli inferiori, in funzione della concentrazione in mg/ml) è stato utilizzato per trattare le linee cellulari HepG2 ed HepB3 in un saggio di attività antiproliferativa per 6 giorni. In entrambe le linee cellulari HB10 è risultato 10 volte più efficace del principio attivo nell'inibire la crescita cellulare come evidenziato dal confronto dei valori di IC_{50} (la concentrazione in grado di inibire il 50% della crescita cellulare): 2.1 vs 0.12 mM per le HepG2 e 3 vs 0.31 mM per le HepB3.

Figura 5. Valutazione dell'espressione dell'antigene di membrana CD44 nelle linee cellulari di epatocarcinoma HepG2 e HepB3 (*Pannello A*). L'analisi è stata condotta mediante citometria a flusso con un anticorpo primario di topo diretto contro il CD44 umano e con un anticorpo secondario anti-topo marcato con FITC. In Figura sono riportati in nero il controllo negativo (costituito dal campione senza l'anticorpo primario) e in bianco il campione in esame.

Pannello B: Valutazione della cinetica di legame di ^{99m}Tc -HA-But nelle linee cellulari HepG2 e HepB3. Il composto marcato, ^{99m}Tc -HA-But purificato, diluito con polimero freddo fino ad ottenere una concentrazione di 5 mg/ml, è stato addizionato alle cellule coltivate in terreno di coltura RMPI 1640 addizionato con 10% (v/v) di siero bovino fetale in *chamber-slide* e lasciato agire per 6 ore a 37°C. La fotografia è stata scattata dopo 6 ore di trattamento.

Pannello C: Valutazione dell'*uptake* cellulare in funzione del tempo. La linea cellulare HepB3, altamente esprimente CD44, ha mostrato un'attività di legame maggiore di quella della linea HepG2, scarsamente

esprimente CD44 raggiungendo la saturazione dopo circa 6 ore dall'inizio del trattamento.

Figura 6. Esame istologico di sezioni di fegato di animali inoculati intrasplenicamente con cellule tumorali e trattati con gli esteri dell'invenzione. Immagini microscopiche rappresentative dell'istologia del fegato di animali inoculati intrasplenicamente con cellule di carcinoma di Lewis LL3 e trattati o no con HA-But. Le sezioni istologiche dello spessore di 4- μ m sono state ricavate da campioni di fegato di animali trattati o di controllo, fissati in formalina 10% e inclusi in paraffina. Dopo colorazione con Cajal-Gallego le sezioni sono state esaminate al microscopio ottico. Nei campioni di fegato derivati da animali trattati con Ha-But non si è notato alcun segno di danno alla morfologia dell'organo eventualmente indotto dal composto.

Figura 7. Diagramma di sopravvivenza di Kaplan-Meier. L'analisi della sopravvivenza di topi inoculati intrasplenicamente con cellule di melanoma B16/F10 e trattati quotidianamente s.c. con HB10 alla dose di 4.8 μ mol/topo/die con richiami settimanali i.p. di 12 μ mol/topo nei giorni 4,11,18,25,31 è stata valutata con il metodo di Kaplan-Meier. Dopo 90 giorni di osservazione, 8 su 10 degli animali trattati erano ancora vivi, mentre lo erano solo 3 su 11 degli animali di controllo.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione riguarda esteri dell'acido butirrico con l'acido ialuronico aventi un grado di sostituzione (rapporto tra il valore medio di moli di residui butirrici e il numero di moli dell'unità disaccaridica GlcNAc-GlcUA) inferiore o uguale a 0.1 e preferibilmente inferiore o uguale a



0.01.

Particolarmente preferiti sono gli esteri caratterizzati da un grado di sostituzione compreso tra 0.001 e 0.08 meglio se compreso tra 0.002 e 0.03 o ancor più preferibilmente compreso tra 0.003 e 0.01. Gli esteri secondo l'invenzione hanno un peso molecolare dell'acido ialuronico compreso tra 10.000 e 100.000 D, ancor più preferibilmente compreso fra 50.000 e 85.000 D.

Gli esteri secondo l'invenzione hanno mostrato una sorprendente attività antiproliferativa, antitumorale e antimetastatica superiore a quella degli esteri butirrici caratterizzati da un grado di sostituzione superiore. Tale effetto è stato osservato sia in esperimenti *in vitro* su linee cellulari tumorali sia *in vivo* su modelli animali di disseminazione metastatica.

In particolare, gli esteri dell'invenzione sono risultati molto attivi su tumori primitivi e metastatici del fegato e più in generale su tumori che esprimono alti livelli di CD44, il principale recettore dell'acido ialuronico.

Pertanto, uno dei principali aspetti dell'invenzione, riguarda l'uso degli esteri sopra definiti per la preparazione di medicinali finalizzati al trattamento di patologie caratterizzate da iper-proliferazione cellulare come nel caso dei tumori con particolare indicazione per i tumori primitivi o metastatici del fegato. Da sottolineare che gli esteri dell'invenzione, a differenza di quanto ottenuto in US 6,140,313 sono stati ottenuti in condizioni di reazione anidre. In queste condizioni, la reazione di esterificazione procede in modo più controllato che non in condizioni non completamente anidre ed è quindi possibile ottenere esteri con bassi gradi di sostituzione variando opportunamente le concentrazioni dei

reagenti. Infatti, in presenza di acqua, come nel caso dei procedimenti dell'arte nota, l'agente acilante viene parzialmente idrolizzato e a causa della scarsa solubilità dell'acido ialuronico nei solventi organici, l'acilazione avviene in fase eterogenea: i gruppi esterei risultano cioè distribuiti in modo non uniforme sulla matrice polimerica.

Nella presente invenzione, invece, il procedimento per la preparazione di esteri butirrici dell'acido ialuronico risulta essere in condizioni anidre ed in fase omogenea ed è basato sull'uso di acido ialuronico in forma di sale quaternario dell'azoto saturo (quale ad esempio un sale di ammonio sostituito con 4 residui alchilici o arilici) o insaturo (per esempio un sale aromatico di N-alchilpiridinio). Viene preferibilmente utilizzato un sale di tetraalchilammonio dell'acido ialuronico che ha buona solubilità in solventi aprotici polari. In particolare, viene preferito il sale di tetrabutilammonio (HA-TBA), ottenuto secondo metodi noti ad es., facendo passare il sale sodico dell'acido ialuronico su uno scambiatore ionico condizionato con TBA. Lo scambiatore ionico preferito è una colonna di resina amberlite IR120 in forma acida, in cui viene fatta riciclare una soluzione acquosa al 40% di TBA per almeno 4 giorni a 40°C e lavata successivamente con H₂O distillata fino ad ottenere un pH<10.

La dissoluzione del sale quaternario dell'acido ialuronico avviene preferibilmente in N,N-dimetilformammide (DMF) anche se altri solventi quali il dimetilsolfossido (DMSO) o N-metilpirrolidone sono comunque utilizzabili. Secondo una realizzazione preferita il procedimento per la preparazione degli esteri butirrici dell'acido ialuronico con grado di

sostituzione inferiore o uguale a 0.1 comprende i seguenti passaggi:

- a) dissoluzione di un sale quaternario dell'azoto dell'acido ialuronico in concentrazione compresa tra 1-100 g/l in un solvente polare aprotico, opzionalmente riscaldando a temperature superiori a 50°C,
- b) preparazione del reattivo acilante mediante miscelazione, in un solvente polare aprotico, di anidride butirrica e di una 4-dialchilamminopiridina,
- c) aggiunta del reattivo acilante alla soluzione del sale dell'acido ialuronico in condizioni anidre,
- d) purificazione del prodotto di reazione o alternativamente conversione dell'estere ottenuto nel sale sodico corrispondente mediante acidificazione.

La reazione di acilazione viene fatta procedere in condizioni anidre, ad esempio in atmosfera di azoto. Catalizzatori preferiti della reazione di acilazione sono le 4-dialchilamminopiridine, fra cui la 4-dimetilamminopiridina (DMAP) e la 4-pirrolidinopiridina (PPY).

L'acido ialuronico viene preferibilmente preparato come HA-TBA in DMF anidro, in concentrazione compresa tra 1 e 100 g/l, più preferibilmente compresa tra 10 – 50 g/l, preferibilmente riscaldato a 80°C fino a dissoluzione avvenuta, lasciando raffreddare a temperatura ambiente.

Una quantità di anidride butirrica in concentrazione compresa tra 0.01 e 5 mol/l (preferibilmente tra 0.1 e 2 mol/l) e di dimetil-amminopiridina (DMAP), in rapporto molare con l'anidride butirrica compreso tra 0.1-10 (preferibilmente tra 0.5 e 2 o addirittura in rapporto equimolare con la quantità di anidride butirrica), in un opportuno volume di DMF anidro

viene fatta gocciolare nella soluzione di HA-TBA, sotto agitazione meccanica, lasciando reagire per almeno un'ora. La reazione viene quindi bloccata con H₂O distillata.

Il sale di tetrabutylammonio dell'estere ialuronico dell'acido butirrico (HA-But) viene poi convertito nel sale sodico corrispondente mediante acidificazione dell'estere ottenuto con un acido diluito, preferibilmente con HCl 0.1 M e quindi neutralizzato con una soluzione satura di sodio idrogenocarbonato.

Le condizioni sopra descritte consentono una sintesi omogenea e l'esterificazione risulta quindi ottimizzata per rese, efficienza di conversione e omogeneità del prodotto ottenuto. Inoltre, in condizioni anidre, la sintesi è più facilmente controllabile e dipende principalmente dalla quantità di anidride butirrica aggiunta.

Infatti è possibile operare anche con quantità limitanti di anidride butirrica ottenendo esteri dell'acido butirrico a basso grado di sostituzione, anche inferiore o uguale a 0.01. Secondo una realizzazione preferita del procedimento al punto c) il reattivo acilante viene aggiunto in quantità tale che il rapporto molare tra anidride butirrica ed unità ripetitiva disaccaridica sia compreso tra 0.004 e 0.3, tra 0.008 e 0.1, oppure ancor più preferibilmente tra 0.01 e 0.03.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda la possibilità di ottenere composizioni farmaceutiche contenenti, quale principio attivo, una quantità terapeuticamente efficace di un estere butirrico secondo l'invenzione in associazione con opportuni diluenti ed eccipienti farmacologicamente accettabili. Infatti, in aggiunta agli esteri

dell'invenzione, tali composizioni possono contenere anche altri principi attivi ed essere impiegabili per uso orale, in forma di polvere granulare, compresse, pillole oppure gel.

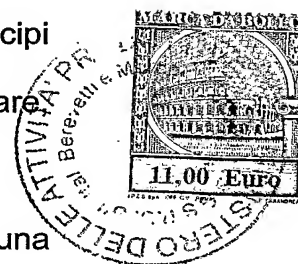
Per gli esteri butirrici dell'invenzione si può prevedere una somministrazione sistemica, orale, parenterale, topica oppure transdermica e sono inoltre adatti ad essere somministrati attraverso le seguenti vie: orale, intravenosa, intraperitoneale, intraarticolare, intramuscolare, subcutanea, rettale, intracavitaria (intravescicale o intravaginale).

La dose terapeuticamente efficace varia di preferenza da 0.2 a 2 g/giorno per 1-15 giorni o, più preferibilmente, tra 0.3 e 1.5 g/giorno.

Prove tossicologiche hanno evidenziato che gli esteri butirrici secondo l'invenzione non sono tossici e che quindi possono essere utilizzati alle dosi previste o a dosi anche superiori.

In caso di iniezioni intravenose, l'estere butirrico viene somministrato di preferenza alla dose di 0.2 - 50 mg/kg/giorno per 8-12 giorni. Se iniettato intraperitonealmente, l'estere butirrico viene di preferenza somministrato come soluzione, preferibilmente in soluzione fisiologica, alla dose di 1-100 mg/kg/giorno (preferibilmente 10-50 mg/kg/giorno) per 8-12 giorni. Infine, nel caso della somministrazione orale, l'estere butirrico viene di preferenza somministrato alla dose di 300-500 mg/kg/giorno per 8-12 giorni.

Come verificato utilizzando il composto radiomarcato con tecnezio, la cui biodistribuzione è stata monitorata scintigraficamente, la somministrazione i.p. o s.c è da preferirsi qualora si voglia evitare la



segregazione del composto a livello epatico. Le immagini scintigrafiche, raccolte dopo 6 ore dalla somministrazione s.c., indicano infatti che ben il 36% di ^{99m}Tc HA-But resta localizzato nel sito di iniezione suggerendo che, a seconda della via di somministrazione applicata, il farmaco può essere veicolato in modo più appropriato ai diversi organi bersaglio: se la somministrazione e.v. è da preferirsi per il trattamento delle lesioni intraepatiche, la via s.c. potrebbe risultare molto più utile per il trattamento delle lesioni di altri organi diversi dal fegato e le vie orale e rettale per il trattamento delle lesioni rispettivamente gastroduodenali e coloretali.

È da sottolineare inoltre che i nuovi esteri dell'invenzione, in cui l'acido butirrico è esterificato con l'HA, sono caratterizzati da un'alta affinità per uno specifico recettore di membrana (CD44). Tale specificità è quindi sfruttabile per veicolare preferenzialmente il farmaco su cellule bersaglio che esprimono alti livelli di tale recettore. Per la loro specificità, gli esteri dell'invenzione sono una valida soluzione nel trattamento di lesioni neoplastiche circondate da tessuto normale come quelle intraepatiche, con una forte riduzione del danno cellulare sulle cellule normali, come normalmente avviene con i classici trattamenti con farmaci citotossici.

La presente invenzione rappresenta quindi un nuovo approccio terapeutico per il trattamento delle lesioni intraepatiche dal momento che gli esteri butirrici dell'invenzione, quando somministrati per via endovenosa, vengono preferenzialmente accumulati nel fegato e internalizzati dalle cellule che iper-esprimono il recettore CD44. Al contrario, la somministrazione del composto per vie diverse

dall'endovenosa, quali la sottocutanea la intraperitoneale, la via orale e rettale, by-passando l'accumulo nel fegato, permette una diversa distribuzione del farmaco con il raggiungimento di concentrazioni efficaci negli organi bersaglio.

PARTE SPERIMENTALE

Abbreviazioni utilizzate

$\%(w/w)_{\text{acido butirrico}}$	% in peso di acido butirrico $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
$\%(w/w)_{\text{butirrato}}$	% in peso di residuo butirrato $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$
nell'estere	
CE-UV	elettroforesi capillare con rivelatore UV
Da	dalton (unità di massa atomica) [equivalente a
g/mol]	
DMAp	4-(dimetilammino)piridina
DMF	N,N-dimetilformammide
DS	grado di sostituzione (<i>degree of substitution</i>)
HA-Na	acido ialuronico, sale di sodio (sodio ialuronato)
HA-But	esteri butirrici dell'acido ialuronico
HA-TBA	acido ialuronico, sale di tetrabutylammonio
M_{dimero}	peso molecolare medio dell'unità ripetitiva
(dimero)	
M_w	peso molecolare medio ponderale
PTFE	poli(tetrafluoroetilene)
TBA	tetrabutylammonio
TBA-OH	tetrabutylammonio idrossido

Materiali

Acido ialuronico, sale di sodio, avente un peso molecolare medio ponderale (M_w) di 85000 Da (per la sintesi HB10) oppure di 61500 Da (per la sintesi HB11 HE1, HE2, HE3 e HE4) (*Bioiberica*).

Anidride butirrica – tetrabutylammonio idrossido, soluzione acquosa al 40% in peso – N,N-dimetilformammide anidra (*Aldrich*). 4-(dimetilammino)piridina (*Fluka*). Sodio carbonato anidro (*Riedel – de Haën*). N,N-dimetilformammide – metanolo – dietiletere – acetone – acido cloridrico al 37% in peso – gel di silice (*Carlo Erba Reagenti*).

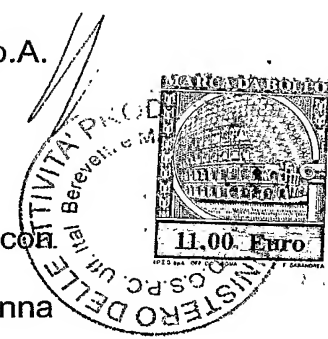
Le dialisi sono state effettuate usando tubi a membrana di cellulosa, con un *cut-off* di pesi molecolari pari a 12000÷14000 Da (*Spectrum SPECTRA/POR 5*), fino a quando la conducibilità elettrica della soluzione non fosse scesa sotto ai 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

La conversione totale dei prodotti a sali di sodio è avvenuta facendo passare le relative soluzioni attraverso una resina a scambio ionico *Amberlite IR-120 (plus)* (*Sigma-Aldrich*) in forma di sale sodico.

Esempio 1. Sintesi del sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (HA-TBA).

La resina a scambio ionico *Amberlite IR-120 (plus)* in forma di sale di tetrabutylammonio (TBA) fu ottenuta da quella in forma acida (*Sigma-Aldrich*) mediante trattamento con una soluzione acquosa al 40% in peso di tetrabutylammonio idrossido, riciclata per 4 giorni attraverso una colonna incamiciata a 40 °C.

HA-Na (500 g – 1.25 eq \equiv mol di unità ripetitiva dimerica) venne disciolto gradualmente in 10 l di acqua bidistillata, mantenendo il sistema sotto



agitazione meccanica ad una temperatura di $\sim 25^{\circ}\text{C}$.

Si carica e ricicla la soluzione in equicorrente (flusso discendente con velocità di ~ 100 ml/minuto) per ~ 24 ore attraverso una colonna contenente resina a scambio ionico *Amberlite IR-120 (plus)* in forma di sale di TBA (7 kg – 30.8 eq). Si scarica la colonna e si lava la resina con acqua bidistillata (~ 13 l), in modo tale da recuperare tutto il prodotto residuo. Si liofilizza, infine, la soluzione viene raccolta ottenendo 690 g (1.11 eq – resa 89%) di HA-TBA ($M_{\text{dimero}} = 620.5$ g/mol), un solido biancastro che si conserva al fresco.

Esempio 2. Sintesi di esteri butirrici dell'acido butirrico con grado di sostituzione compreso tra 0.004 e 0.8.

Viene qui descritta la preparazione degli esteri butirrici dell'acido ialuronico (HA-But) indicati con le sigle HB10, HB11, HE1, HE2, HE3 e HE4. La sintesi è stata effettuata a temperatura ambiente, in battente di azoto e sotto agitazione meccanica.

5 g (8.1×10^{-3} eq \equiv mol di unità ripetitiva dimerica) di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio (HA-TBA) sono stati disciolti completamente in 100 ml di N,N-dimetilformammide anidra (DMF) (*Fluka*) a 80°C , e la soluzione ottenuta viene fatta raffreddare sino a temperatura ambiente.

Una soluzione al 25% in peso di anidride butirrica in quantità di 0.02 – 0.12 – 0.44 – 0.85 – 1.6 – 3.1 ml (corrispondenti rispettivamente a 0.12 – 0.73 – 2.7 – 5.2 – 9.8 – 19 mmol per le sintesi di HB10 – HB11 – HE1 – HE2 – HE3 – HE4) (*Fluka*) e al 20% in peso di 4-(dimetilammino)piridina (equimolare all'anidride butirrica) (*Fluka*) in un volume variabile, in funzione della quantità di anidride butirrica, di DMF anidra è stata

aggiunta goccia a goccia, in circa 15 minuti, alla soluzione di HA-TBA. La reazione è stata fatta proseguire ancora per 75 minuti nelle medesime condizioni, bloccandola poi mediante aggiunta di acqua distillata.

La conversione dal sale di tetrabutylammonio (TBA) al sale sodico (Na) del prodotto HA-But è stata eseguita mediante acidificazione con acido cloridrico (HCl) 0.1 M e neutralizzazione con una soluzione satura di sodio idrogenocarbonato (NaHCO_3).

La soluzione è stata quindi concentrata a circa un quinto del volume originario usando un evaporatore rotante a pressione ridotta; il polimero è stato poi precipitato versando la soluzione concentrata in almeno tre volumi di acetone e il precipitato è stato separato per filtrazione ed essiccato sotto vuoto. Il prodotto ottenuto è stato poi purificato per dialisi della soluzione acquosa del solido grezzo contro acqua distillata, usando tubi da dialisi a membrana di cellulosa con un *cut-off* di pesi molecolari pari a 12÷14 kDa (*Visking*). Gli esteri butirrici dell'acido ialuronico in forma di sale sodico sono stati quindi ottenuti mediante liofilizzazione quali solidi bianchi o biancastri. La struttura dei composti fu determinata mediante spettroscopia di risonanza magnetica del protone ($^1\text{H-NMR}$), eseguita su soluzioni in dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d_6) a 200 o 500 MHz usando gli spettrometri Bruker 200 AC o Varian Inova 500, rispettivamente.

In figura 2 è riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del composto HE2 ($\text{DS} = 0.2$) ottenuto per confronto tra l'area del segnale relativo al gruppo metilico (δ 0.83 ppm, tripletto) del residuo butirrico con l'area del segnale relativo

al gruppo metilico (δ 1.92 ppm, singoletto) del gruppo N-acetile appartenente al residuo glucosamminico dell'acido ialuronico. Si notano inoltre i segnali dei gruppi metilenici (δ 1.54 ppm, multipletto; δ 2.32 ppm, tripletto) del residuo butirrato e quelli tipici dell'acido ialuronico (a valori di δ compresi tra 3.2 e 4.7 ppm).

La determinazione del grado di sostituzione degli esteri ottenuti è stata eseguita mediante elettroforesi capillare con rivelazione UV (CE-UV) (Figura 2) e il grado di sostituzione in butirrato è stato ricavato come riportato, a titolo esemplificativo, per i seguenti prodotti:

$$\text{HB11: } \text{DS}_{\text{butirrato}} = 0.025 - \%(w/w)_{\text{butirrato}} = 0.53 - \%(w/w)_{\text{acido butirrico}} = 0.54$$

(il peso molecolare medio dell'unità ripetitiva dimerica è: $M_{\text{dimerico}} = 402.8$ g/mol).

$$\text{HB10: } \text{DS}_{\text{butirrato}} = 0.004 - \%(w/w)_{\text{butirrato}} = 0.08 - \%(w/w)_{\text{acido butirrico}} = 0.08$$

Il peso molecolare medio dell'unità ripetitiva dimerica è quindi: $M_{\text{dimerico}} = 401.3$ g/mol.

Analogamente per altri prodotti ottenuti con la sintesi descritta nell'esempio 1, furono rilevati i seguenti gradi di sostituzione: 0.1 (HE1), 0.2 (HE2), 0.4 (HE3) e 0.8 (HE4).

Esempio 3. Scale-up della sintesi di esteri ialuronici dell'acido butirrico.

La sintesi è stata effettuata in condizioni di agitazione meccanica, a temperatura ambiente e sotto flusso di azoto. 55 g di HA-TBA, pari a 8.9×10^{-2} eq (moli di unità ripetitive dimeriche), furono completamente disciolti in 3 l di DMF anidra (Fluka). L'agente acilante fu preparato miscelando 4 ml (2.45×10^{-2} mol) di anidride butirrica (Fluka) e 3 g

(2.46×10^{-2} mol) di DMAP (Fluka) in 200 ml di DMF anidra.

La soluzione di anidride butirrica fu aggiunta goccia a goccia alla soluzione di HA-TBA in DMF in un lasso di circa 25 minuti. La reazione fu fatta procedere per ulteriori 65 minuti.

Il sale di tetrabuttilammonio sodio dell'HA-But è stato quindi convertito nel corrispondente sale sodico mediante aggiunta di acqua distillata Milli-Q (~6 l), acidificazione con HCl 0.1 M e neutralizzazione con NaOH 1 M. Il polimero è stato poi purificato mediante dialisi contro acqua distillata Milli-Q (14 x 30 l/ciascuna) in un tubo con membrana di cellulosa (*cut-off* di pesi molecolari 12÷14 kDa; *Visking*) e poi su una colonna contenente 500 ml (0.95 eq) di resina a scambio ionico Amberlite IR-120 (plus) in forma di sale sodico (*Aldrich*) a temperatura ambiente per 1 ora. La quantità finale del composto HA-But, ottenuto come sale sodico per liofilizzazione a freddo (denominato HB4), fu di 34 g (8.4×10^{-2} eq; resa del 94%).

Il contenuto in acido butirrico dell'estere così preparato fu stato determinato mediante elettroforesi capillare con rilevatore UV utilizzando uno strumento Applied Biosystems HPCE Modello 270A-HT, con capillare di silice (72 cm x 50 µm I.D. x 375 µm O.D.; *Supelco*). Le condizioni analitiche utilizzate sono state: temperatura 27°C, pressione 16.9 kPa (1.5 s), voltaggio 20 kV, rilevazione UV a 195 nm, tampone Borax 50 mM (pH=9.5) (*Sigma*), soluzione di lavaggio 0.1 M NaOH. Le curve di calibrazione sono state ottenute utilizzando la seguente serie di concentrazioni scalari: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1% (v/v) di acido butirrico in acqua distillata Milli-Q (*Millipore*). L'estere butirrico è stato



quindi idrolizzato in 0.1 M NaOH a temperatura ambiente per 2 ore e la reazione interrotta per neutralizzazione con HCl 0.1 M. La concentrazione finale di HB4 è stata di 2 mg/ml.

La misurazione dell'acido butirrico è stata effettuata in triplicato e i limiti di rivelazione (L.O.D.) e di quantificazione (L.O.Q.) sono stati calcolati come segue:

$L.O.D.=3.33*S/m$; $L.O.Q.=10*S/m$; dove S è la deviazione standard dell'intercetta delle 3 curve di calibrazione ed m è la media della pendenza delle 3 curve di calibrazione.

Nell'elettroferogramma del polimero idrolizzato (Figura 2) il picco dell'acido butirrico ha mostrato un tempo di migrazione di 20.55 min, mentre il picco dell'acido ialuronico ha mostrato un tempo di migrazione di 15 min. Il valore calcolato di L.O.D. è stato di 4.43 µg/ml e quello di L.O.Q. di 13.30 µg/ml. Analizzato mediante CE-UV, HB4 è risultato quindi avere un DS 0.062, una % (w/w) di butirrato di 1.33 e un peso molecolare riferito all'unità dimerica di 405.36 g/mol.

Esempio 4 Valutazione *in vitro* dell'attività biologica degli esteri dell'invenzione.

L'effetto antiproliferativo di dosi scalari degli esteri preparati secondo l'Esempio 2 fu valutato su una linea di carcinoma di colon umano (HT29) e una linea di epatocarcinoma umano (HepB3) (Figura 3, pannello A e B, rispettivamente) acquistate dall'*American Tissue Culture Collection*.

Le due linee cellulari furono seminate alla densità di 1000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti in terreno RPMI 1640 addizionato con il 10% (v/v) di siero bovino fetale. Dopo 24 ore di adesione, il terreno di

semina è stato rimosso e sostituito con quello contenente gli esteri secondo l'invenzione. Le cellule sono state mantenute in presenza di concentrazioni scalari di acido ialuronico (HA) (intervallo: 0.016 - 4 mg/ml), di esteri butirrati (HE3/T, HB4, HB10 e HB11 (intervallo: 0.016 - 4 mg/ml) o di sodio butirrato (intervallo: 0.016 - 4 mM) per 6 giorni. Gli esperimenti furono condotti almeno due volte e ciascuna condizione sperimentale è stata allestita in 8 repliche. L'effetto antiproliferativo è stato valutato usando il metodo del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e i precipitati di formazano così ottenuti sono stati risospesi in dimetilsolfossido e misurati spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 540 nm. I pozzetti contenenti tutti i reagenti eccetto le cellule sono state usate come bianco. L'effetto dei composti in esame è stato espresso come percentuale d'inibizione rispetto al controllo (costituito da cellule mantenute nel solo terreno di coltura).

Tutti i monoesteri butirrici testati hanno mostrato un effetto inibitorio dose-dipendente nettamente superiore a quello esercitato dal principio attivo da solo. In particolare, il composto a minor grado di sostituzione (0.004 - HB10) è risultato in grado di indurre, nelle cellule HT29, il 50% di inibizione ad una concentrazione (in termini di butirrato) circa 60 volte inferiore a quella necessaria per ottenere lo stesso effetto con il principio attivo (Figura 3A).

Anche sulle cellule Hep3B tutti i monoesteri butirrici testati hanno mostrato un effetto inibitorio dose-dipendente nettamente superiore a quello esercitato dal principio attivo da solo (Figura 3B). In queste cellule, in particolare, il composto a minor grado di sostituzione è

risultato in grado di inibire il 50% della crescita cellulare ad una concentrazione (in termini di butirrato) circa 120 volte inferiore a quella necessaria per ottenere lo stesso effetto con il principio attivo.

Esempio 5. Valutazione *in vitro* dell'effetto antiproliferativo degli esteri dell'invenzione in funzione dell'espressione del recettore per l'acido ialuronico CD44.

L'espressione del recettore CD44 nelle due linee cellulari di epatocarcinoma Hep3B e HepG2 è stata valutata mediante citometria a flusso utilizzando un anticorpo monoclonale murino contro il CD44 umano (clone 5F12; *Neo Markers, Labvision, Fremont, CA*) ed un anticorpo secondario di capra anti-topo coniugato con FITC (*Sigma, St. Louis, MO*) secondo tecniche note. Il controllo negativo è stato ottenuto incubando il campione con il solo anticorpo secondario. Dopo la marcatura immunofluorescente, le cellule sono state incubate con ioduro di propidio (5 g/ml), RNase (10 kU/ml), (*Sigma*), e Nonidet P40 (0.005%) e la fluorescenza è stata misurata con un citometro a flusso FACScan (*Becton Dickinson, San Jose, CA*) equipaggiato con un laser ad argon. Il segnale fluorescente è stato acquisito sia in modalità lineare che logaritmica. L'esame citometrico ha dimostrato che solo il 18% delle cellule HepG2 esprimono i recettori CD44 sulla loro superficie cellulare, contro il 78% delle cellule HepB3 (Figura 5A).

Come mostrato in Figura 4, nonostante la differente espressione di CD44, in entrambe le linee cellulari l'estere butirrico HB10 è stato in grado di inibire la proliferazione cellulare in modo dose-dipendente. Dopo 6 giorni di trattamento, nelle cellule HepB3, HA-But alla

concentrazione più alta (4 mg/ml corrispondente ad una concentrazione di 1 mM di acido butirrico) ha indotto una pressoché completa inibizione della crescita cellulare (90%), mentre nelle cellule HepG2 che esprimono CD44 in bassa percentuale, è stata osservata solo una moderata inibizione (60%). Tale risultato suggerisce però che, anche in presenza di una bassa percentuale di cellule esprimenti il recettore per l'HA, HA-But è in grado di ridurre considerevolmente la crescita cellulare. Infatti, in entrambe le linee cellulari HA-But si è dimostrato molto più efficace del sodio butirrato con una diminuzione del valore di IC_{50} di circa 10 volte rispetto a quello osservabile con il solo principio attivo (2.1 vs 0.12 mM nelle cellule HepG2 e 3 vs 0.31 mM nelle cellule HepB3) suggerendo che l'uso di un veicolatore adeguato può significativamente incrementare l'attività biologica del sodio butirrato senza peraltro influenzare negativamente l'attività biologica a causa della presenza di una molecola ingombrante come quella dell'HA.

Esempio 6. Valutazione della cinetica di legame con esteri butirrici marcati. Studi *in vitro* e *in vivo*.

La cinetica di legame degli esteri dell'invenzione sulle linee cellulari epatiche HepG2 e HepB3 è stata valutata come uptake cellulare dell'estere butirrico marcato con tecnezio (^{99m}Tc -HA-But). Infatti, HA e HA-But sono stati marcati Tecnezio-99m (^{99m}Tc), il radioisotopo più frequentemente utilizzato a scopo radiodiagnostico, per investigare secondo metodi noti la biodistribuzione *in vivo* di un dato composto. La stabilità dei marcati è stata valutata in presenza di siero di ratto per almeno 6 ore e durante questo intervallo di tempo non è stata osservata



la formazione di ^{99m}Tc -pertechnetato confermando la stabilità del complesso metallo-polimero.

Per gli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate le linee cellulari HepG2 e HepB3 incubate con HA-But purificato marcato e diluito con HA nativo non marcato fino alla concentrazione finale di 5 mg/ml, a 37°C. Dopo incubazione con ^{99m}Tc -HA-But, la radioattività totale legata è stata misurata mediante un γ -contatore. In parallelo, per verificare il legame specifico di HA ai recettori di membrana CD44, le cellule sono state pre-trattate con una soluzione di HA (50 mg/ml) non marcato per 4 ore a 37°C.

Come mostrato in Figura 5B, gli esperimenti di *uptake* cellulare, condotti utilizzando ^{99m}Tc -HA-But, hanno confermato quanto già osservato in citofluorimetria flusso. Inoltre, gli esperimenti di tempo-dipendenza (Figura 5C) hanno indicato che le due linee cellulari hanno una cinetica di legame differente: l'attività di legame delle HepB3 aumentava in modo tempo-dipendente e raggiungeva il *plateau* circa 6 ore dopo l'inizio del trattamento, mentre le cellule HepG2 mostravano una limitata attività di legame che iniziava a decrescere già dopo 4 ore.

Per quanto riguarda gli esperimenti *in vivo*, le immagini scintigrafiche indicano che dopo somministrazione e.v., il composto marcato si accumula preferenzialmente nel fegato, in modo analogo a quanto si osserva con l'acido ialuronico nativo. Questo risultato non è sorprendente considerando che l'HA circolante è fisiologicamente degradato dalle cellule endoteliali sinusoidali epatiche via CD44. L'analisi *ex vivo* ha indicato inoltre un notevole accumulo di ^{99m}Tc -HA-But

anche nella milza, risultato non sorprendente considerando il ruolo che la milza svolge nella degradazione dell'HA. Quando invece della percentuale di radioattività accumulata in un dato organo, viene considerata la quantità assoluta di ^{99m}T -HA-But per g di tessuto (in modo da considerare le reali dimensioni dell'organo in oggetto), si osserva che la milza accumula 40.8 μCi per g di tessuto rispetto al fegato che ne accumula 55.3 μCi per g di tessuto.

Come atteso, l'elevato accumulo di composto marcato osservato nel fegato dopo somministrazione e.v., diminuisce notevolmente quando ^{99m}T -HA-But viene somministrato i.p. o s.c. indicando che la i.p. possa essere una via di somministrazione particolarmente utile per evitare la segregazione dell'HA a livello epatico. Le immagini scintigrafiche, raccolte dopo 6 ore dalla somministrazione s.c., hanno mostrato inoltre che ben il 36% di ^{99m}Tc HA-But resta localizzato nel sito di iniezione suggerendo che la diversa via di somministrazione potrebbe essere sfruttata per veicolare in modo più appropriato il farmaco: l'e.v. potrebbe essere la via di somministrazione d'elezione per il trattamento delle lesioni intraepatiche, mentre la via s.c. potrebbe essere molto più utile per il trattamento di lesioni più facilmente accessibili e per le quali un lento rilascio potrebbe risultare più appropriato.

Esempio 7. Valutazione *in vivo* della tossicità acuta e subacuta degli esteri.

E' stata dapprima valutata la tossicità acuta dell'estere butirrico HB10 preparato come descritto nell'Esempio 2 e somministrato per via endovenosa. La dose risultata letale per il 50% degli animali trattati

(LD₅₀) è stata superiore a 4.8 µmoli /topo.

Tabella 1. Tossicità acuta del trattamento *in vivo* con HB10 somministrato per via endovenosa.

Dose HA-But (µmoli/topo)	Via di somministrazione	Mortalità n. morti/n. totale	Variaz. peso corporeo (g)♠
2.4 (µmoli)	e.v.	0/5	+0.70
4.8 (µmoli)	e.v.	0/5	+0.40
12 (µmoli)	i.p.	0/5	+0.70
24 (µmoli)	s.c.	0/5	+0.60

Nell'esperimento riportato in Tabella 1, gruppi di 5 topi femmine Swiss del peso di 20-22 g sono stati trattati endovena con HB10 alle concentrazioni indicate. La variazione media del peso corporeo (♠) è espressa come variazione del peso tra la misura presa 24 ore prima e 6 giorni dopo il trattamento. Al termine del trattamento gli animali sono stati osservati per un ulteriore periodo di 30 giorni. Con nessuna dose impiegata furono osservate delle morti.

Tabella 2. Tossicità subacuta del trattamento *in vivo* con HB10 somministrato per via intraperitoneale o sottocutanea.

Dose HA-But (µmoli/topo/die)	Via di somministrazione (giorni)	Mortalità n. morti/n. totale	Variaz. peso corporeo (g)♠
12 (µmoli)	i.p. (10)	0/10	+0.40
4.8(µmoli)	s.c. (25)	0/15	+0.30

Nell'esperimento riportato in Tabella 2, gruppi di 10-15 topi femmine BD2F1 del peso di 20-22 g sono stati trattati secondo la via di somministrazione indicata con le concentrazioni di 12 μ mol/topo i.p. o 4.8 μ mol/topo s.c. di HB10. La variazione media del peso corporeo (\blacktriangle) è espressa come variazione del peso tra la misura presa 24 ore prima e alla fine del trattamento. Al termine del trattamento gli animali sono stati osservati per un ulteriore periodo di 30 giorni. Con nessuna dose impiegata furono osservate delle morti.

La mancanza di tossicità da parte dell'estere butirrico è stata confermata dalla sopravvivenza a lungo termine degli animali (fino a 90 giorni) e dalle minime variazioni del loro peso (Tabella 2).

Esempio 8. Attività *in vivo* degli esteri butirrici secondo l'invenzione: valutazione dell'attività antimetastatica e dell'effetto sulla sopravvivenza.

Poiché gli studi di biodistribuzione *in vivo*, condotti con HA-But marcato con tecnezio, hanno dimostrato che dopo somministrazione e.v. la distribuzione preferenziale del composto è a livello epatico si è deciso di sfruttare questa peculiarità a fini terapeutici indagandone l'attività antitumorale su modelli animali di neoplasie epatiche. Per disporre di un modello *in vivo* più simile a quanto si osserva in clinica è stato scelto, perciò, il modello animale che prevede l'inoculo intrasplenico di cellule di carcinoma di Lewis LL3 o di melanoma B16-F10, entrambe in grado di colonizzare spontaneamente nel fegato. Il modello sperimentale messo a punto e utilizzato in questa serie di esperimenti è quindi diverso da quello che prevede la colonizzazione del fegato da parte di cellule

tumoriali iniettate direttamente in circolo e utilizza un meccanismo di invasione metastatica più simile a quello che si osserva in clinica.

Animali. Negli esperimenti descritti, sono stati utilizzati topi di ceppo C57BL/6, C57BL/6xDBA/2F1 (BD2F1) e CBA/Lac acquistati presso la *Harlan & Nossan, San Giovanni al Natisone, Udine, Italia*, di età compresa tra i 3 e i 6 mesi e del peso di 18-20 g. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo la normativa attualmente in vigore in Italia (DDL 116, 21/12/92) e in accordo con The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (DHHS Publ. No [NIH], 86-23, Bethesda, MD: NIH, 1985).

Cellule. La linea di carcinoma del polmone di Lewis lung (LL3) è stata ottenuta dalla *Tumor Depository Bank, NCI, NIH (Bethesda, USA)* e mantenuta in coltura mediante passaggi seriali in accordo con i protocolli dell'NCI: 1×10^6 cellule tumorali vitali ottenute da una singola sospensione e preparate per dissezione di un tumore primitivo cresciuto in un animale donatore per 2 settimane, sono state iniettate i.m. nella zampa sinistra di topi femmina ceppo C57BL/6. I frammenti di tessuto ottenuti sono stati filtrati attraverso un doppio strato di garza sterile, centrifugati a $200 \times g$ per 10 min e le cellule così ottenute sono state risospese in un adeguato volume di soluzione tamponata sterile. Le cellule sono state poi contate usando il metodo già noto ad esclusione col Trypan Blue.

Le cellule di melanoma maligno B16-F10, originariamente ottenute dalla *Tumor Depository Bank, NCI, NIH (Bethesda, USA)*, sono state coltivate in terreno MEM addizionato con 10% di siero bovino fetale, 1% di



aminoacidi non-essenziali, 1% di sodio piruvato, 1% L-glutamina (100x), 1% di soluzione antibiotica standard, 2% NaHCO_3 e 1% glucosio e mantenute in incubatore al 5% di CO_2 in atmosfera umida a 37°C . Le cellule tumorali così ottenute sono state poi inoculate intrasplenicamente, in ambiente sterile, in topi femmine ceppo BD2F1 preventivamente anestetizzate mediante iniezione i.p. di Zoletil (70 mg/kg) (*Virbac srl, Milan, Italy*). Circa 2×10^5 cellule di carcinoma di Lewis LL3 o 1×10^5 di cellule di melanoma B16/F10 sono state inoculate dopo opportuno dissolvimento in una soluzione di Matrigel (150 $\mu\text{g/ml}$, *Beckton Dickinson*) che ne consente un miglior attecchimento nell'organo. Dopo 4 giorni dall'inoculo (necessari per consentire alle cellule tumorali di attecchire) gruppi di 8 animali ciascuno sono stati trattati i.p. o s.c. con 0.6 μmol (250 $\mu\text{l/topo}$) di HB10, preparato come descritto nell'Esempio 2, in dose sicuramente non tossica come dimostrato in precedenti studi di tossicità acuta e cronica, e trattati quotidianamente fino al giorno 10. Gli animali di controllo invece sono stati trattati i.p. o s.c. con un uguale volume di soluzione fisiologica. Dopo 15 giorni dall'inoculo delle cellule LL3 o dopo 21 giorni dall'inoculo delle cellule B16/F10 gli animali sono stati sacrificati, i loro fegati espiantati e la formazione delle metastasi valutata utilizzando uno stereo-microscopio dotato di griglia calibrata.

Analisi statistica. I dati sperimentali sono stati analizzati con l'ausilio di software adeguati e la significatività statistica dell'effetto del trattamento rispetto al controllo è stata valutata applicando il test di Student, mentre per valutare l'effetto di HA-But sulla formazione delle metastasi è stato

utilizzato il test esatto di Fisher. La sopravvivenza degli animali è stata invece valutata mediante l'analisi di Kaplan-Meier. Solo valori di probabilità inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Gli eventuali effetti tossici di HA-But sul parenchima epatico sono stati valutati microscopicamente in sezioni da 4 μm colorate con Cajal-Gallego, ottenute da campioni di fegato fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina.

L'effetto di HB10 sulla sopravvivenza degli animali portatori di tumore è stato investigato in una serie parallela di esperimenti in cui topi femmine BD2F1, inoculati intrasplenicamente con 1×10^5 cellule di melanoma B16/F10, sono stati trattati s.c. con 0.15 μmoli (125 $\mu\text{l}/\text{topo}/\text{giorno}$) di HA-But dal giorno 4 dopo l'inoculo al giorno 32 (giorno in cui si è osservata la morte del primo animale di controllo), con un'ulteriore somministrazione i.p. di 12 $\mu\text{moli}/\text{topo}$ ai giorni 4, 11, 18, 25 e 31. La sopravvivenza degli animali è stata monitorata fino alla morte dell'ultimo animale di controllo.

In Tabella 3 è riportato l'effetto di HA-But somministrato i.p. o s.c. alla concentrazione di 0.6 μmoli sulla formazione delle metastasi epatiche. Nel modello con l'inoculo delle cellule LL3, dopo 15 giorni dall'impianto il trattamento con HA-But è stato in grado di ridurre significativamente la colonizzazione del fegato tanto che l'87% (13/15) degli animali trattati era libero da metastasi microscopicamente accertabili e solo un animale per gruppo di via di somministrazione (i.p. o s.c.) presentavano foci metastatici. Al contrario, nel gruppo di controllo solo il 13% (2/15) degli

animali era libero da metastasi. Una risposta simile è stata osservata anche nei topi inoculati con le cellule di melanoma B16-F10. Dopo 21 giorni dall'impianto, tutti gli animali trattati con gli esteri butirrici dell'invenzione (HA-But o HB10) erano liberi da metastasi microscopicamente visibili, mentre tutti gli animali di controllo presentavano numerose lesioni metastatiche.

Tabella 3. Effetto del trattamento i.p. o s.c. con HB10 per 7 giorni sulla formazione di metastasi epatiche indotte dall'impianto intrasplenico di cellule di carcinoma di Lewis LL3 o di melanoma B16-F10

		LL3		B16/F10	
Via di somministraz.	Tratt.	N. di metastasi al fegato	N. animali senza metastasi	N. di metastasi al fegato	N. animali senza metastasi
s.c.	control	>10	1/7	>10	0/7
	HA-But	< 5	6/7*	-	6/6*
i.p.	control	>10	1/8	>10	0/8
	HA-But	< 5	7/8*	-	7/7*

*P<0.05, rispetto al controllo (test esatto di Fisher).

Come mostrato in Figura 6, che riporta l'esame istologico del parenchima epatico, il trattamento HB10 non ne altera la morfologia. Degna di nota l'osservazione che, nonostante le vie di somministrazione usate siano state quelle meno suggerite dall'analisi di biodistribuzione, ma utilizzate perché le più praticabili nel modello murino, HA-But è risultato essere molto efficace nell'inibire la formazione delle metastasi



epatiche suggerendo che il trattamento per un periodo sufficientemente lungo possa consentire ad HA-But di essere efficace indipendentemente dalla via di somministrazione.

L'analisi di Kaplan-Meier (Figura 7) applicata per valutare l'effetto del trattamento con HA-But sulla sopravvivenza degli animali inoculati intrasplenicamente con cellule di melanoma B16/F10 (modello scelto per la sua particolare aggressività e per l'elevata percentuale di positività per il recettore CD44) ha evidenziato che gli animali trattati anche con bassi dosi di HA-But ($4.8 \mu\text{mol}/\text{topo}/\text{die}$) avevano un intervallo di sopravvivenza statisticamente significativo rispetto agli animali di controllo: dopo 90 giorni dall'inizio dell'esperimento l'80% degli animali trattati con HA-But era ancora vivo in confronto al 27% osservato nel gruppo di controllo. Da sottolineare che tutti gli animali trattati con HA-But sono risultati ancora vivi dopo 5 mesi dall'inizio dell'esperimento un intervallo considerevolmente lungo in considerazione della vita media di questi animali e la particolare aggressività del modello cellulare utilizzato.

I risultati fin qui ottenuti sembrano indicare che gli esteri dell'invenzione contenenti l'acido butirrico (il più piccolo degli inibitori delle iston-deacetilasi) e l'HA, possono rappresentare un'ottima alternativa per la stabilizzazione e la veicolazione dell'acido butirrico e un approccio promettente per il trattamento delle lesioni intraepatiche. Senza dubbio l'uso di inibitori delle iston-deacetilasi come agenti antitumorali non è nuovo e alcuni di essi (fenilbutirrato, acido suberoililideidroxamico, MS-275, depsipeptide) sono attualmente allo studio in trial clinici di fase I

e il per il trattamento di tumori solidi e dei linfomi. È importante notare però che nessuno di questi farmaci soddisfa appieno una delle principali richieste della terapia oncologica: la somministrazione selettiva di molecole antitumorali direttamente alle cellule bersaglio.

In questa ottica, HA-But la cui molecola *carrier* (HA) è caratterizzato da un'alta affinità per uno specifico recettore di membrana, noto per essere iper-espresso dalle cellule tumorali, potrebbe costituire una svolta nel trattamento delle lesioni intraepatiche primitive e metastatiche d'altra origine.

Esempio 9. Attività degli esteri dell'acido butirrico sulla metastatizzazione di cellule tumorale derivate da linfoma TLX5.

Collateralmente agli studi precedenti, è stata valutata l'attività farmacologia degli esteri butirrici dell'acido ialuronico preparati secondo l'Esempio 2, anche su un altro modello tumorale sperimentale: un linfoma (TLX5) murino che cresce in forma ascitica nel peritoneo. Il trattamento unico sottocutaneo con HB10 alla dose di 12 μ mol/topo effettuato 24 ore dopo l'inoculo tumorale, ha diminuito significativamente il numero di cellule tumorali presenti nel peritoneo al momento del sacrificio degli animali. Come mostra la Tabella 4, tale effetto non è però stato accompagnato da un significativo incremento del tempo di sopravvivenza degli animali trattati.

Tabella 4. Effetto del trattamento *in vivo* con HA-But sul tempo di sopravvivenza, sul numero delle cellule tumorali e sulla loro disseminazione nel cervello in topi portatori del linfoma TLX5.

Trattamento (μ mol/topo)	Sopravvivenza♣ (giorni)	Ascite peritoneale♦ (numero cellule $\times 10^6$)	Bioassay dei cervelli♠ sopravvivenza (giorni)
Controlli	10.4 \pm 0.6	916.0 \pm 129.4	14.2 \pm 1.1
Habut (12)	9.0 \pm 1.3	507.5 \pm 39.5*	15.5 \pm 0.5

*P<0.05, rispetto al controllo (T-test).

Per gli esperimenti riportati in Tabella 4, gruppi di 10 topi maschi ceppo CBA/Lac sono stati inoculati i.p. con 100.000 cellule del linfoma TLX5 e trattati 24 ore dopo l'impianto tumorale con HB10 alla dose unica di 12 μ mol/topo (0,5 ml s.c.). In 5 animali per gruppo è stato valutato il tempo di sopravvivenza (♣), mentre i rimanenti venivano sacrificati in 8^a giornata per la conta delle cellule tumorali peritoneali (♦). A questi animali veniva anche prelevato il cervello (sede preferenziale di metastatizzazione per questo modello sperimentale) per reinocularlo sottocute ad animali sani dello stesso ceppo in cui è stata valutato il tempo di sopravvivenza (♠). I dati sono espressi come media \pm e.s.

Quando il trattamento con HB10 è stato viene fatto direttamente nel peritoneo, per assicurare un contatto diretto tra cellule tumorali e composto, e ripetuto per 7 giorni consecutivi alle dosi di 6 e 12 μ mol/topo/die, si è osservata una diminuzione dose-dipendente statisticamente significativa del carico tumorale non accompagnata però da un concomitante incremento del tempo di sopravvivenza degli animali trattati (Tabella 5).

Tabella 5. Effetto di trattamenti ripetuti *in vivo* con HA-But sul tempo di sopravvivenza, e sul numero delle cellule tumorali in topi portatori del linfoma TLX5.

Trattamento (μ mol/topo)	Sopravvivenza* (giorni)	% abbattimento carico tum.	Ascite peritoneale♦ (numero cellule $\times 10^6$)
Controlli	9.6 \pm 0.2		689.0 \pm 126.0
Habut (6)	10.4 \pm 0.8	32	471.3 \pm 48.1*
Habut (12)	11.6 \pm 0.6	69	216.3 \pm 48.5*

*P<0.05, rispetto al controllo (T-test).

Negli esperimenti descritti in Tabella 5, gruppi di 8 topi maschi ceppo CBA/Lac, inoculati i.p. con 100.000 cellule del linfoma TLX5, sono stati trattati 24 ore dopo l'impianto tumorale con HB10 alle dosi di 6 o 12 μ mol/topo (250 μ l o 500 μ l i.p.) per 7 giorni consecutivi. In 5 animali per gruppo è stato valutato il tempo di sopravvivenza (*), mentre nei rimanenti animali, in 8^a giornata è stata effettuata la conta delle cellule tumorali peritoneali (♦). I dati sono espressi come media \pm e.s.

Alla dose più alta (12 μ mol/topo) gli esteri butirrici secondo l'invenzione hanno indotto un abbattimento del carico tumorale del 69% che corrisponde mediamente a 2 giorni di vita in più per gli animali trattati rispetto ai controlli. Anche un tale abbattimento però non impedisce la disseminazione metastatica delle cellule leucemiche a livello meningeo, come evidenziato dai dati del *bioassay* che non hanno mostrato differenze di sopravvivenza tra topi trattati e controlli. A questo proposito va ricordato che per tutti i modelli tumorali sperimentali in forma ascitica esiste una correlazione diretta tra numero di cellule presenti nel

peritoneo dell'animale e la sua morte, determinata dal tempo di
replicazione specifico per ogni tipo di neoplasia.



RIVENDICAZIONI

1. Estere butirrico dell'acido ialuronico in cui i gruppi ossidrilici sono parzialmente esterificati con residui butirrici e caratterizzato da un grado di sostituzione di residui butirrici (rapporto tra il numero di residui di acido butirrico ed unità disaccaridica GlcNAc-GlcUA) inferiore o uguale a 0.1.
2. Estere secondo la rivendicazione 1 caratterizzato da un grado di sostituzione compreso tra 0.001 e 0.08.
3. Estere secondo la rivendicazione 2 caratterizzato da un grado di sostituzione compreso tra 0.002 e 0.03.
4. Estere secondo la rivendicazione 2 caratterizzato da un grado di sostituzione compreso tra 0.003 e 0.01.
5. Estere secondo le rivendicazioni 1-4 dove il peso molecolare dell'acido ialuronico è compreso tra 10.000 e 100.000 D.
6. Estere secondo le rivendicazioni 1-4 dove il peso molecolare dell'estere è compreso tra 50.000 e 85.000 D.
7. Procedimento per la preparazione di esteri butirrici dell'acido ialuronico in fase omogenea ed in condizioni anidre, caratterizzato dal fatto di utilizzare l'acido ialuronico in forma di un sale quaternario dell'azoto.
8. Procedimento in accordo con la rivendicazione 7 per la preparazione di esteri butirrici dell'acido ialuronico aventi un grado di sostituzione inferiore o uguale a 0.1 comprendente i seguenti passaggi:
 - a) dissoluzione di un sale quaternario dell'azoto dell'acido ialuronico in concentrazione compresa tra 1-100 g/l in un solvente polare aprotico,

opzionalmente riscaldando a temperature superiori a 50°C,

b) preparazione del reattivo acilante mediante miscelazione, in un solvente polare aprotico, di anidride butirrica e di una 4-dialchilamminopiridina,

c) aggiunta del reattivo acilante alla soluzione del sale dell'acido ialuronico in condizioni anidre,

d) purificazione del prodotto di reazione o alternativamente conversione dell'estere ottenuto nel sale sodico corrispondente mediante acidificazione.

9. Procedimento in accordo con la rivendicazione 8 in cui il sale quaternario dell'azoto è un sale di tetraalchilammonio.

10. Procedimento in accordo con la rivendicazione 8 in cui il sale di tetraalchilammonio è un sale di tetrabutylammonio.

11. Procedimento in accordo con la rivendicazione 8 dove il punto a) ed il punto b) sono effettuati in ordine inverso.

12. Procedimento in accordo con le rivendicazioni 8 dove il solvente polare aprotico di cui al punto a) è scelto tra: DMF, DMSO.

13. Procedimento in accordo con la rivendicazione 8 dove al punto b) (miscelazione di anidride butirrica e di una 4-dialchilamminopiridina) il solvente polare aprotico è DMF, ed anidride butirrica e 4-dialchilamminopiridina sono miscelate in quantità equimolari.

14. Procedimento in accordo con la rivendicazione 13 dove la 4-dialchilamminopiridina è una 4-dimetilamminopiridina.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 8 dove il reattivo acilante preparato al punto b), comprendente anidride butirrica in concentrazione

tra 0.01 e 5 mol/l o ancor più preferibilmente tra 0.1 e 2 mol/l, è gradualmente aggiunto alla soluzione del sale dell'acido ialuronico in atmosfera di azoto, opzionalmente mantenendo la soluzione risultante in agitazione meccanica.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 15 dove la reazione di acilazione viene bloccata aggiungendo acqua distillata.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 8 dove la purificazione, vedi punto d) del procedimento, avviene mediante conversione da sale carbossilico dell'azoto quaternario a sale di sodio e successiva separazione del prodotto dai reagenti.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 17 dove tale separazione si esegue mediante precipitazione in acetone, seguita da filtrazione, dialisi di una sua soluzione acquosa e liofilizzazione

19. Procedimento secondo la rivendicazione 17 dove detta conversione è ottenuta mediante acidificazione dell'estere ottenuto con acido cloridrico diluito e neutralizzazione con una soluzione satura di sodio idrogenocarbonato.

20. Procedimento secondo le rivendicazioni 7-19 dove al punto c) il reattivo acilante viene aggiunto in modo da ottenere un rapporto molare tra anidride butirrica ed unità ripetitiva disaccaridica compreso tra 0.004 e 0.3.

21. Procedimento secondo la rivendicazione 20 dove tale rapporto molare è compreso tra 0.01 e 0.03.

22. Esteri butirrici dell'acido ialuronico ottenibili con il procedimento secondo le rivendicazioni 20-21.



23. Uso degli esteri secondo le rivendicazioni 1-6 e 22 per la preparazione di un medicamento per il trattamento di patologie caratterizzate da una anormale proliferazione cellulare.

24. Uso secondo la rivendicazione 23 dove le patologie caratterizzate da anormale proliferazione cellulare sono i tumori primitivi e metastatici.

25. Uso secondo la rivendicazione 24 dove tali tumori sono primitivi di origine epatica, oppure metastasi epatiche derivate da tumori primari localizzati in altri organi.

26. Una composizione farmaceutica contenente quale principio attivo una quantità terapeuticamente efficace di almeno un estere butirrico secondo le rivendicazioni 1-6 e 22, opzionalmente in associazione con altri principi attivi o con altri esteri butirrici, e comprendente opportuni diluenti ed eccipienti farmacologicamente accettabili.

27. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 26 per uso orale, in forma di polvere granulare, compresse, pillole oppure gel.

28. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 26 per uso rettale, in forma di supposta o di soluzione per enteroclisma.

29. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 26 adatta alla somministrazione attraverso le seguenti vie: sistemica, endovenosa, intraperitoneale, intraarticolare, sottocutanea o intramuscolare, in forma di soluzione o sospensione acquosa.

30. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 26, caratterizzata dal fatto di comprendere almeno un altro principio attivo in aggiunta agli esteri butirrici dell'acido ialuronico secondo le rivendicazioni 1-6 e 22.

(SM/pd)

Milano, li 29 Marzo 2004

p. COIMEX S.C.R.L. UNITED COMPANIES

PERBELLINI ALBERTO

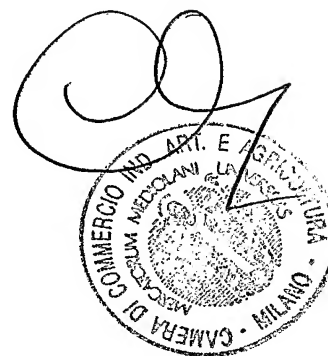
CORADINI DANILA

Il Mandatario



Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



fora fora

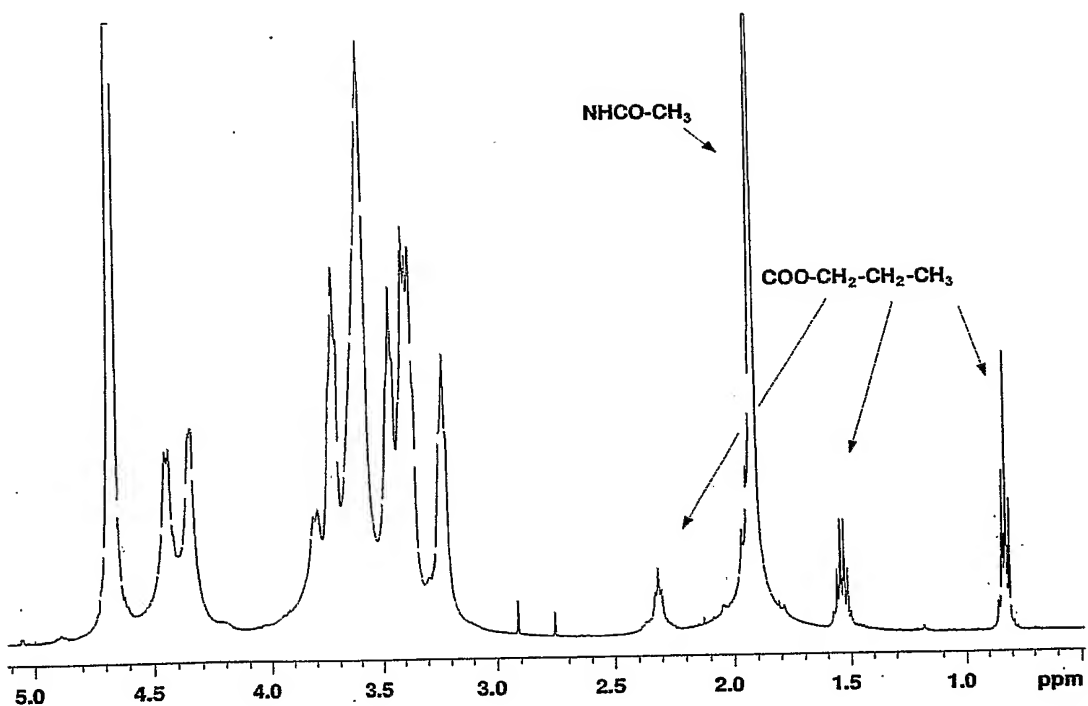


FIGURA 1

MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

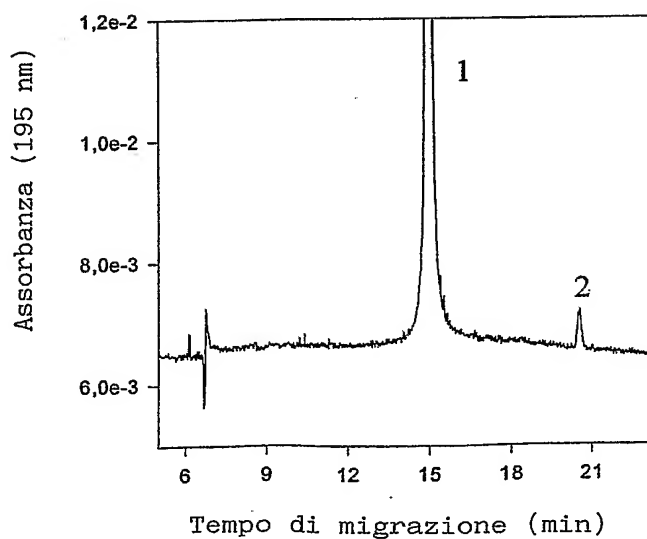


FIGURA 2



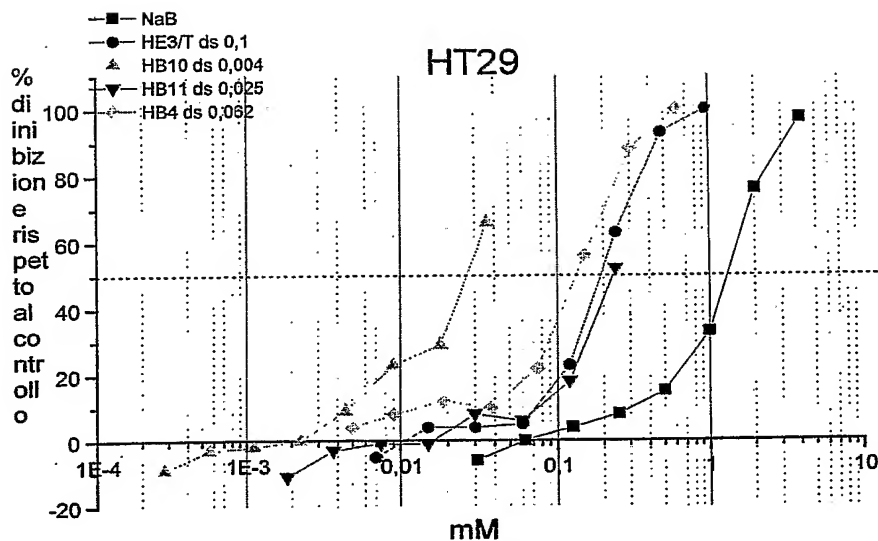


FIGURA 3a

MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

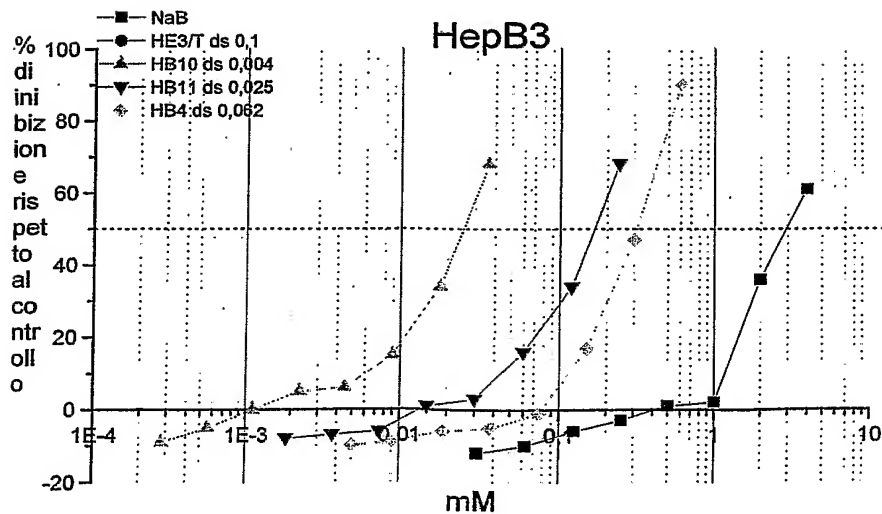
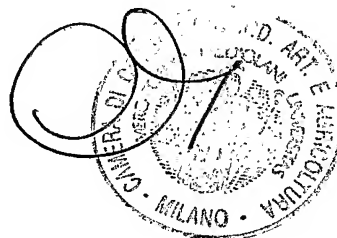


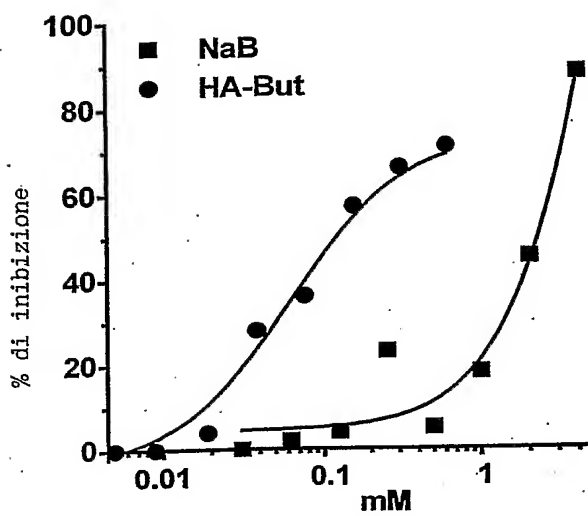
FIGURA 3b



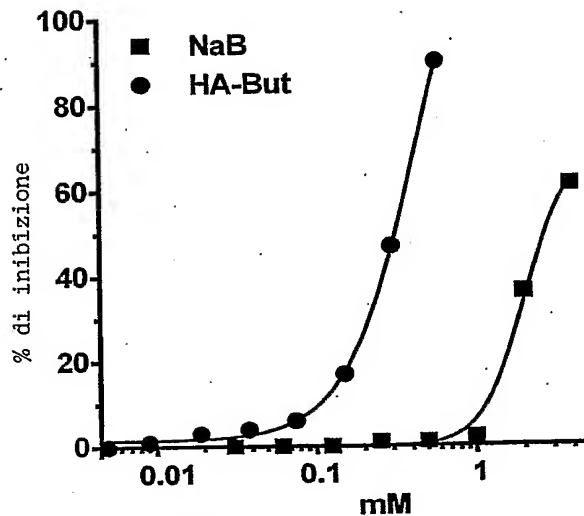
[Handwritten signature]



HepG2



HepB3



MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

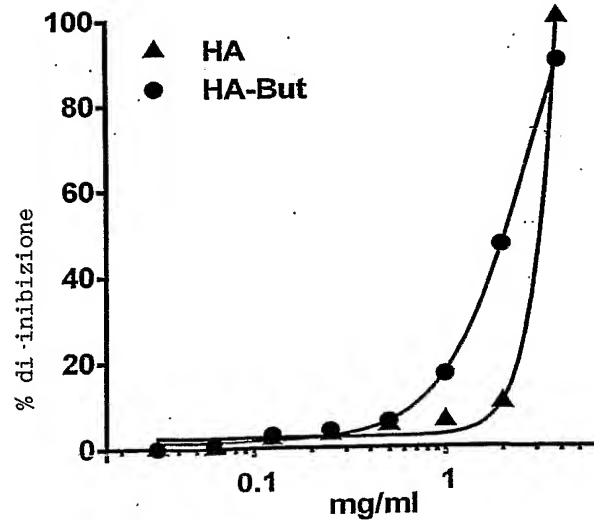
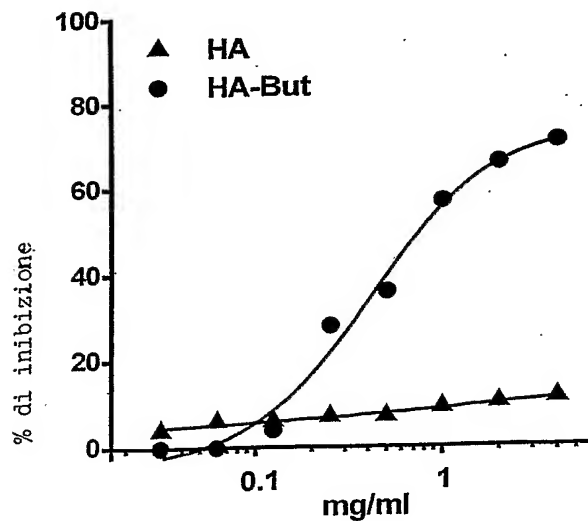
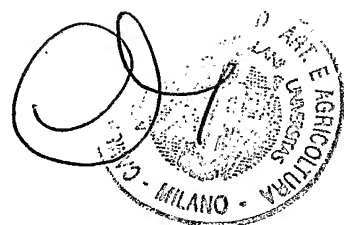
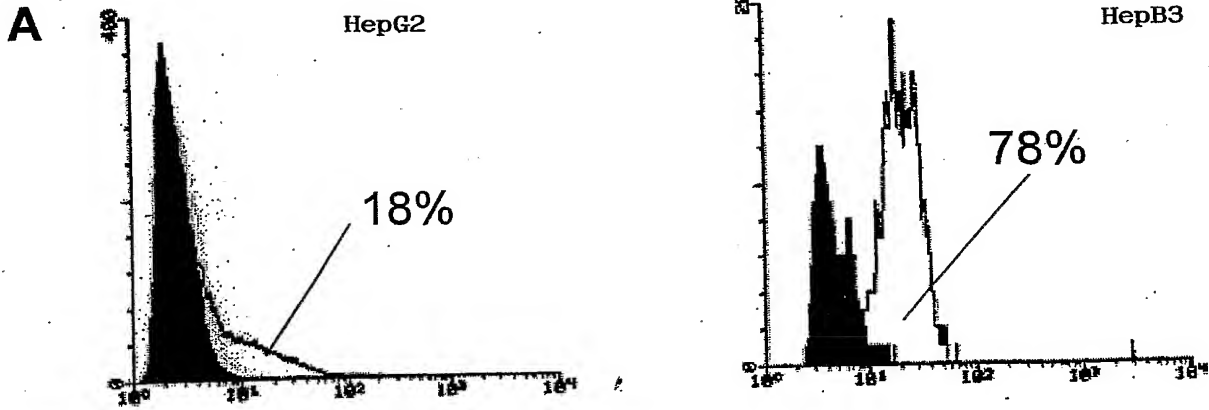


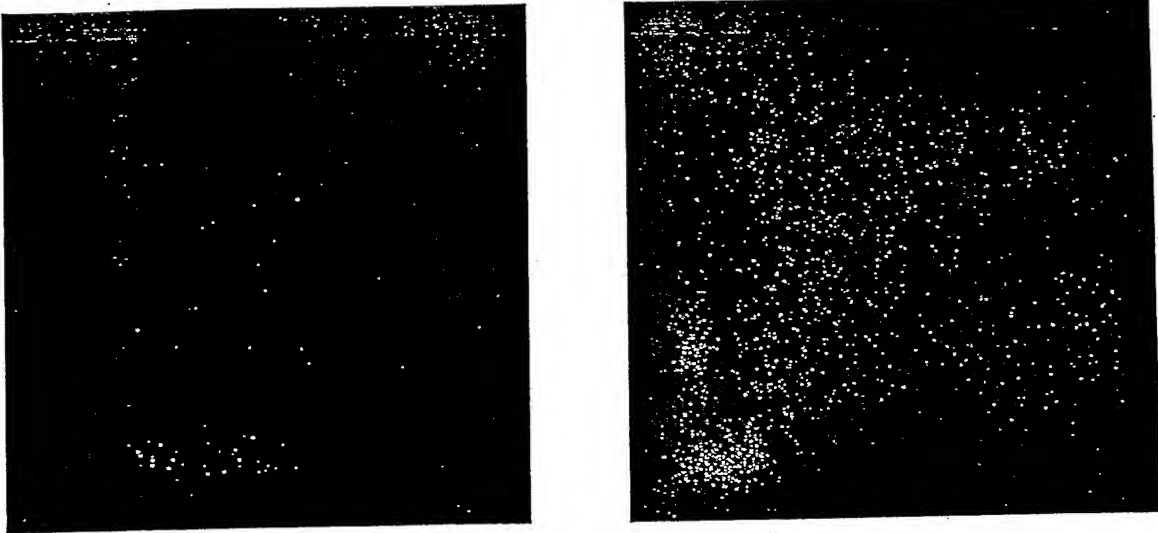
FIGURA 4



firm firm



B



MI 2004 A 0 0 0 6 0 5

C

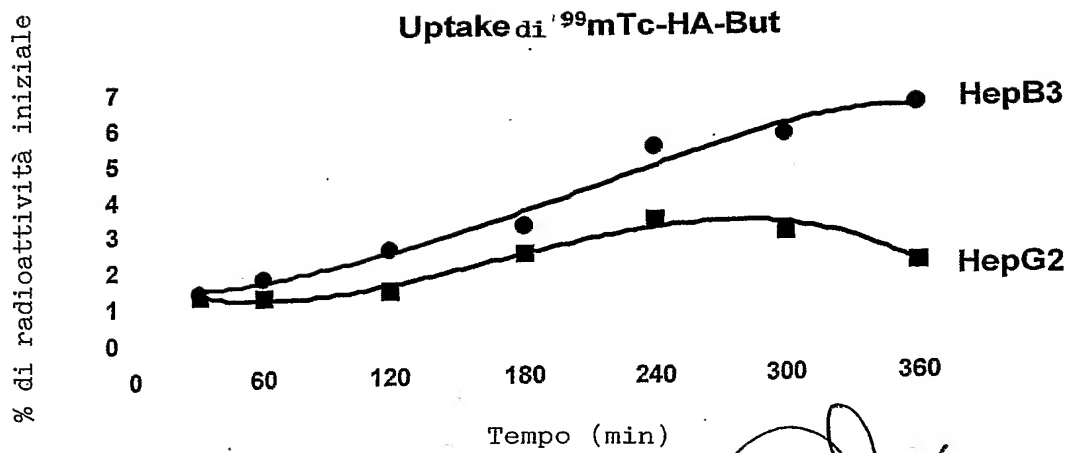
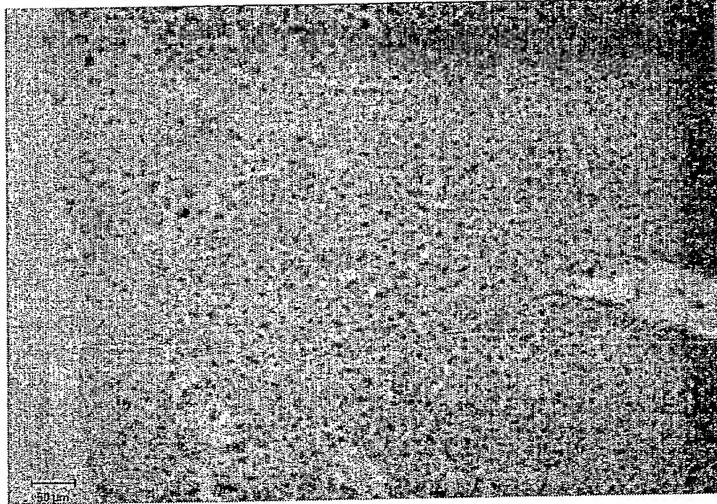


FIGURA 5

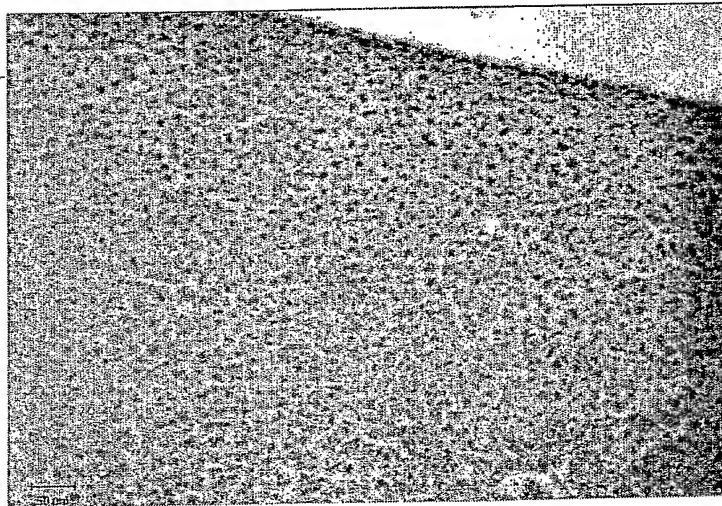


[Handwritten signature]

LL3



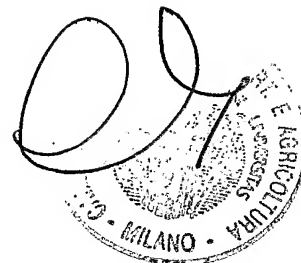
CTR



HA-But

MI 7004 A 0 0 0 6 0 5

FIGURA 6



James J. J.

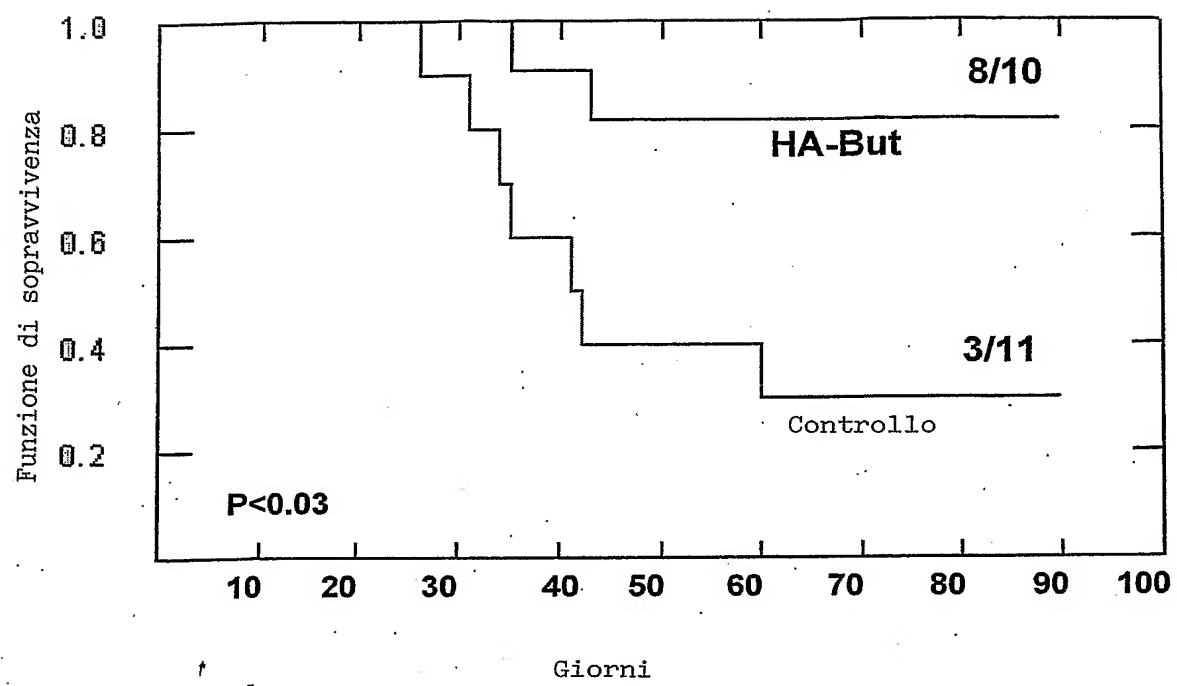


FIGURA 7

00000605

